

## 鱼类体细胞移核胚胎发育影响因素的探讨

刘同明, 俞小牧, 叶玉珍, 王忠卫, 周建峰, 吴清江<sup>1</sup>

(中国科学院水生生物研究所 淡水生态和生物技术重点实验室, 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 将脱膜后的泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 受精卵置于不同孵化液中孵化, 结果表明, 孵化液 1 × Holtfreter 中正常鱼苗和总鱼苗的孵化率最高, 分别为 54.8% 和 59.2%。1/2 × Holtfreter、1/10 × Holtfreter、曝气冷开水和改变孵化液处理, 正常鱼苗的孵化率差别不大, 分别为 48.0%、49.6%、50.0% 和 48.8%。曝气冷开水畸形率最高, 为 8.8%。PBS 不适合用作孵化液。机械损伤对胚胎的孵化率无明显影响 (73.39% vs. 75.70%), 但对胚胎发育有明显的致畸作用 (8.06% vs. 0)。以雌核发育鳙 (*Aristichthys nobilis*) 尾鳍培养细胞作供体, 泥鳅未受精卵作受体, 微卫星标记分析表明, 移核胚胎的核来源于供体核, 受体卵中未除去的核被排斥。供体细胞培养代数严重影响移核胚胎的发育率。随着培养代数的增加, 移核胚胎的发育率逐渐降低。继代核移植可提高移核胚胎的发育率, 尤其是第 1 次体细胞继代核移植, 晚期囊胚的发育率急剧上升 (43.84% vs. 7.69%), 说明继代核移植可促进受体卵对供体核的再程序化。泥鳅和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 未受精卵作受体, 其移核胚胎发育率无明显区别 (7.69% vs. 7.02%)。

**关键词:** 鱼类; 体细胞; 核移植; 胚胎发育

**中图分类号:** Q343.5; Q959.468; **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2002)02-0107-06

## Studies on Factors Affecting the Development of Embryos from Somatic Cell Nuclear Transplantation in the Fish

LIU Tong-ming, YU Xiao-mu, YE Yu-zhen, WANG Zhong-wei,  
ZHOU Jian-feng, WU Qing-jiang<sup>1</sup>

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,  
the Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430072, China)

**Abstract:** For comparison of hatching rate, fertilized eggs of *Misgurnus anguillicaudatus* were cultured in different mediums. The results showed that normal and total fries in 1 × Holtfreter were the highest, reached 54.8% and 59.2%, respectively. There was no difference in hatching rate of normal fries between 1/2 × Holtfreter, 1/10 × Holtfreter, cold boiled water and changed mediums. They reached 48.0%, 49.6%, 50.0% and 48.8%, respectively. Rate of abnormal fries was the highest in cold boiled water, reached 8.8%. PBS was not suitable for cultured medium. Mechanic injury had no considerable effects on hatching rate of embryos (73.39% vs. 75.70%), but abnormal fries increased considerably (8.8% vs. 0). Cultured cells from caudal fin of gynogenetic bighead carp (*Aristichthys nobilis*) were used as donor cells, and unfertilized eggs of *Misgurnus anguillicaudatus* were used as recipient eggs. Microsatellite marker analysis showed that the nuclei of nuclear transfer embryos came from the donor nuclei, the nucleus contained in the recipient eggs was rejected or degraded. The passage number of cultured cells critically affected developmental rate of nuclear transfer embryos. With the increase of the passage number, developmental rate of nuclear transfer embryos was decreased. Serial nuclear transfer facilitated reprogramming of nuclear transfer embryos. Developmental rate could be heightened by serial nuclear transfer, especially for the first serial nuclear transfer of somatic cells, rate of late blastula of nuclear transfer embryos increased abruptly from 7.69% to 43.84%. There was no considerable difference in developmental rate of nuclear transfer embryos between *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* unfertilized recipient eggs (7.69% vs. 7.02%).

**Key words:** Fish; Somatic cell; Nuclear transfer; Embryonic development

收稿日期: 2001-12-03; 接受日期: 2002-01-31

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39830300)

1. 通讯作者 (Corresponding author), Tel: (027)-87647706, Fax: (027)-87875132, E-mail: qjwu@ihb.ac.cn

细胞核移植技术是研究细胞核发育全能性、细胞核和细胞质的相互关系、动物克隆和纯系建立等理论问题和应用技术的最好方法之一(刘同明和吴清江,2000)。核移植的设想最初由 Spemann(1938)提出,随后由 Comandon & Fondrune(1939)用单细胞动物变形虫进行尝试并获得成功。14年后,美国科学家 Briggs & King(1952)又在两栖类中获得成功。但真正将细胞核移植技术应用于鱼类的还是我国的科学家童第周(童第周等,1963)。他们开拓性地用金鱼和鲫鱼进行实验,证明了鱼类同样可以进行核移植。

自1997年世界首例体细胞克隆羊“多莉”(Dolly)诞生以来,克隆技术已在哺乳类得到广泛的应用(Wilmut *et al.*, 1997)。但克隆动物还面临很多问题,如成功率低、早衰、有生理缺陷等。而影响核移植成功率的因素很多,包括供体细胞和受体卵的质量、供受体细胞周期的配合、二者的遗传背景;供体传代数、细胞有害遗传突变积累、核的能力;受体卵对供体核的再程序化能力;操作者的技术熟练程度及机械损伤等(Rideout *et al.*, 2000)。克隆动物的低成功率大大限制了其在实际中的应用。

硬骨鱼类具有产卵数量多;培养条件简单,易于在实验室饲养;胚体几近透明,易于观察以及产卵过程可人为控制等优点(刘同明和吴清江,2000),因而不少种类常被选作核移植的材料。在我国,泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)具有较高的经济价值,在人工养殖条件下一年四季均可产卵,是较为理想的实验材料。本文以泥鳅成熟受精卵为材料,探讨了孵化条件和机械损伤对胚胎发育的影响;并以雌核发育鳙(*Aristichthys nobilis*)尾鳍培养细胞为供体,泥鳅成熟未受精卵为受体,研究了培养细胞的传代数和继代核移植对移核胚胎发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 泥鳅和大鳞副泥鳅成熟卵的准备及相关实验

成熟雌泥鳅每千克体重注射6mg鲤鱼脑垂体,雄泥鳅剂量减半。催产后9h左右收集成熟的卵子和精子。受精卵和未受精卵用0.25%胰酶脱膜。为了保证实验结果的准确性,采用受精率为98%以上的同批未受精卵作为受体卵。

在泥鳅正常脱膜受精卵的动物极中央,注入5nL左右的1×Holtfreter,与未注入的脱膜受精卵比

较,通过孵化率和畸形率了解机械损伤对胚胎发育的影响。

以泥鳅和大鳞副泥鳅脱膜未受精卵作受体,雌核发育鳙尾鳍培养细胞为供体,在未受精卵动物极中央注射5nL左右的1×Holtfreter作对照,作为成熟未受精卵对移核胚胎发育影响的实验。

以雌核发育鳙尾鳍培养代数分别为5、10和15代的细胞为供体,移核胚胎数分别为76、70和83个,进行培养细胞传代数对移核胚胎发育影响的实验。

移核胚胎发育至晚期囊胚时,分离胚胎细胞又作为下一代核移植的供体即为继代核移植。移核卵数至少在65枚以上。

### 1.2 雌核发育鳙尾鳍细胞的培养和同步化

雌核发育鳙尾鳍细胞参考文献(Pollard & Walker, 1997)培养。具体操作如下:雌核发育鳙尾鳍经消毒后,用灭菌的弯头剪刀剪成1mm<sup>2</sup>大小的组织块。将组织块在28℃的薄层培养基中贴壁30min,使其贴在培养瓶上。然后在没有组织块的培养瓶一面加5mL含10%胎牛血清的M199培养基,以避免冲掉组织块。翻转培养瓶继续培养24h,以后每3d换1次培养基。参考文献(Mercer *et al.*, 1990)上的方法,并略加修改使培养细胞同步化。培养细胞经传代培养3d后,继续在含0.5%胎牛血清的M199培养基培养3d,使细胞同步在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。

### 1.3 核移植方法及显微操作

核移植方法参考文献(童第周等,1963)进行。将移核后的胚胎移到1×Holtfreter中孵化。以晚期囊胚的比率来统计移核胚胎的发育率。

### 1.4 微卫星标记分析

分离20个左右的移核晚期囊胚,按文献(萨姆布鲁克等,1992)并略加修改提取DNA。把分离的晚期囊胚加200μL抽提缓冲液,再加蛋白酶K至终浓度为100μg/mL。将裂解细胞的悬液置于50℃中水浴3h,然后加入等体积的平衡酚,缓慢地来回颠倒离心管10次,静置10min使两相分开,取出150μL有机相再离心(这一步对提取微量DNA及减少损失非常重要)。其余操作步骤同参考文献。微卫星引物序列来源于斑马鱼(*Danio rerio*)的报道序列(G40422)。引物1:GCACTTGAAAGGGCTTTTIG;引物2:TCAGTTCCTCTGGCTCAGT。反应条件为预变性95℃,10min;95℃,30s;52℃,45s;72℃,90s。共

40 个循环。终延伸 72℃, 10 min。扩增产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 脱膜受精卵孵化条件的优化

泥鳅受精卵用 0.25% 胰酶脱膜后, 分别置于不同的孵化液中孵化。孵化结果表明: 孵化液为 1× Holtfreter, 正常鱼苗和总鱼苗的孵化率最高。曝气冷开水虽然与 1× Holtfreter 的鱼苗孵化率差别不大 (59.2% vs. 58.8%), 但鱼苗畸形率高于 1× Holtfreter (8.8% vs. 4.4%)。通常采用的改变孵化液 (童第周等, 1980), 即将移核后的胚胎置于 1× Holtfreter 中; 待胚胎发育到 2 至 4 细胞期时, 将孵化液冲淡为 1/2× Holtfreter; 胚胎发育到原肠胚时, 再将它们移至曝气冷开水中孵化。这种改变孵化液处理的孵化率仅为 54.4%, 其效果并不是很好。而 PBS 孵化率最低, 为 0, 不适合用作移核胚胎的孵化液

(表 1)。总之, 受精卵在 1× Holtfreter 中孵化效果最好 (59.2%), 其次是曝气冷开水 (58.8%)。因而 1× Holtfreter 是最好的孵化液。

### 2.2 机械损伤对胚胎发育的影响

把胰酶脱膜后的正常受精卵动物极中央注入 1× Holtfreter 作为一种机械损伤。结果表明机械损伤对孵化率影响不大 (73.39% vs. 75.70%), 但对胚胎发育有明显的致畸作用 (8.06% vs. 0) (表 2)。

### 2.3 不去核的未受精卵可以作为核移植的受体

在未注射供体核的泥鳅和大鳞副泥鳅未受精卵的对照中, 均没有一个胚胎发育到晚期囊胚 (表 3)。表 3 还显示泥鳅和大鳞副泥鳅未受精卵作受体无明显的区别 (7.69% vs. 7.02%)。微卫星标记分析表明, 移核胚胎的核来源于供体核, 受体卵中未除去的核不参与移核胚胎的发育 (图 1)。这个结果提示不去核的未受精卵可以作为核移植的受体, 尤其是在供体和受体亲缘关系较远时。

表 1 不同孵化液对泥鳅受精脱膜卵孵化率和畸形率的影响

Table 1 Effects of different incubation media on hatching rate and abnormal rate of fertilized eggs without chorion of loach

孵化液 Incubation media	受精卵总数 Total number of fertilized eggs	鱼苗总数 Total fries	孵化率 Hatching rate (%)	正常鱼苗 Normal fries	畸形鱼苗 Abnormal fries	畸形率 Abnormal rate (%)
1× Holtfreter	250	148	59.2	137	11	4.4
1/2× Holtfreter	250	129	51.6	120	9	3.6
1/10× Holtfreter	250	138	55.2	124	14	5.6
曝气冷开水 Cold boiled water	250	147	58.8	125	22	8.8
PBS	250	0	0	0	0	0
改变孵化液 Changed incubation media	250	136	54.4	122	14	5.6

表 2 机械损伤对泥鳅受精卵胚胎发育的影响

Table 2 Effects of mechanical injury on fertilized eggs of loach

	胚胎数 Number of embryos	鱼苗总数 Total fries	孵化率 Hatching rate (%)	正常鱼苗 Normal fries	畸形鱼苗 Abnormal fries	畸形率 Abnormal rate (%)
正常脱膜受精卵 Fertilized eggs without chorion	107	81	75.70	81	0	0
注射 Holtfreter 的脱膜受精卵 Fertilized eggs without chorion after injection of Holtfreter	124	91	73.39	81	10	8.06

为适应显微操作对较高质量卵子的要求, 选卵的标准不一, 导致表 2 中的孵化率较表 1 高。

Better eggs resulted in higher hatching rate in Table 2 than in Table 1.

表 3 泥鳅和大鳞副泥鳅成熟未受精卵对移核胚胎发育的影响

Table 3 Effects of mature unfertilized eggs of loach and large scale loach on development of nuclear transfer embryos

	泥鳅未受精卵 Unfertilized eggs of loach	对照 Control	大鳞副泥鳅未受精卵 Unfertilized eggs of large scale loach	对照 Control
移核胚胎数 Number of nuclear transfer embryos	104	251	114	204
晚期囊胚 Late blastulae	8	0	8	0
发育率 Developmental rate (%)	7.69	0	7.02	0

## 2.4 培养细胞传代数对移核胚胎发育的影响

结果显示培养 5 代的细胞作供体, 移核胚胎发育至晚期囊胚的比率最高, 为 13.16%; 培养 15 代的细胞作供体, 发育至晚期囊胚的比率最低, 仅为 4.65% (图 2)。这个结果表明随着培养代数的增加, 移核发育至晚期囊胚的比率逐渐降低。我们推测在传代过程中随着传代数的增加, 培养细胞逐渐累积了遗传突变, 这些突变不利于受体卵对供体核的再程序化。



图 1 移核胚胎的微卫星标记分析

Fig.1 Microsatellite marker analysis of embryos from nuclear transfer

1. pGEM-7zf (+) /Hae III; 2. 培养细胞 DNA (供体); 3. 移核混合晚期囊胚 DNA; 4. 泥鳅 DNA (受体)。
1. pGEM-7zf (+) /Hae III; 2. DNA of cultured cells (donor); 3. DNA of mixed late blastulae from nuclear transfer; 4. DNA of loach (recipient)

## 2.5 继代移植对移核胚胎发育的影响

继代移植即移核胚胎发育至晚期囊胚时, 分离胚胎细胞作为下一代核移植的供体。结果显示, 继代核移植可提高移核胚胎的发育率。尤其是体细胞第 1 次继代核移植, 晚期囊胚的比率急剧上升 (43.84% vs. 7.69%) (图 3), 说明继代核移植可促使受体卵对供体核的再程序化。

## 3 讨论

鱼类传统建立纯系的方法是应用两代连续的雌核发育并结合人工转性 (吴清江等, 1981) 来完成。如果将单性发育 (如雌核发育等)、细胞培养和核移植技术结合起来, 仅 1 代即可建立纯系, 育种时间至少可以缩短 1 个世代。这对于一些生长周期比较长, 又与国民经济密切相关的四大家鱼纯系的建立, 是十分快捷实用的。

童第周等 (1963) 曾将囊胚中期的细胞核移入未去核的卵子中, 也曾得到正常的幼鱼。不去核的移

核胚胎的发育过程及幼鱼的形态与去核的无明显区别。余来宁等 (1989) 用核型和同工酶进一步比较了去核和不去核的核移植, 分析表明二者无明显的区别, 都获得了二倍体核质杂种鱼, 说明卵子中未挑去的单倍体核被排斥了。我们以雌核发育鳙尾鳍培养细胞为供体, 泥鳅未受精卵为受体, 微卫星标记分析也表明, 受体卵中未除去的核被排斥, 不参与移核胚胎的发育。这一结果进一步验证了前人的报道。

供体细胞的传代数严重影响移核胚胎的发育。我们的实验结果表明, 随着传代数的增加, 移核胚胎的发育率急剧下降。其原因可能是, 部分培养细胞的染色体组成偏离正常的染色体数, 发生异倍化 (Rio *et al.*, 1973; Watanabe *et al.*, 1978; 陈敏容等, 1985)。以异倍化的细胞作为供体, 这样的移核胚胎必然败育。

继代数也是影响核移植成功率的一个重要因素。成功的继代核移植仅有少数报道 (Willadsen, 1989; Westhusin *et al.*, 1991; Cheong *et al.*, 1993; Kwon & Kono, 1996)。在两栖类, 继代核移植能够延长移植核的再程序化时间, 因而有利于移核胚胎的发育 (DiBerardino *et al.*, 1984)。对哺乳动物的研究表明, 继代核移植有利于移核胚胎的发育 (Stice & Robl, 1988)。陈宏溪等 (1986) 以鲫鱼肾组织的短期培养细胞为供体, 移植到同种鱼的去核卵内得到囊胚, 再将它的囊胚细胞核第 2 次移植到同种鱼的去核卵内, 最后得到 1 尾成鱼。它的染色体为 150, 外观像雌鱼, 但实际上它的性腺发育不良。余来宁等 (1996) 用电融合法, 先将草鱼肝细胞株的细胞核与草鱼的未受精卵融合, 获得了囊胚细胞, 再将此囊胚细胞核进行第 2 次继代移入草鱼的未受精卵内, 最后在继代核移植胚胎中获得 1 尾 1 年龄的移核鱼。但并未检查移核鱼的染色体。我们的实验结果表明继代核移植可改善移核胚胎的发育, 尤其供体细胞是体细胞的核移植。但 Piotrowska *et al.* (2000) 以同步化的供体细胞研究发现, 继代核移植对移核胚胎发育并没有明显的改善, 甚至影响移核胚胎的发育。是否因使用材料的不同而形成如此截然相反的结论, 还有待进一步研究。

目前无论是体细胞核移植还是胚胎细胞核移植, 核移植的成功率都很低。有很多因素影响核移植的成功率, 如: ①供体细胞不合适的细胞周期; ②移核胚胎的倍性能否正确地保持; ③供体细胞周期和受体卵细胞周期是否协调; ④不合适的受体卵不

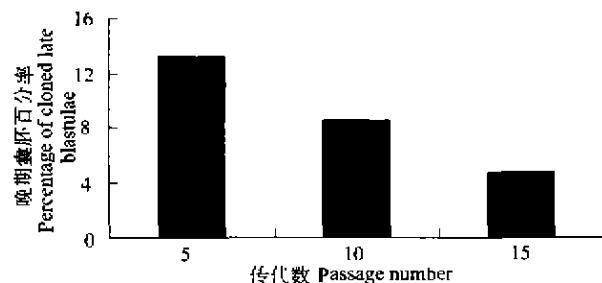


图2 不同培养代数的供体细胞对移核胚胎发育的影响  
Fig.2 Effects of donor cells of different passage number on development of nuclear transfer embryos

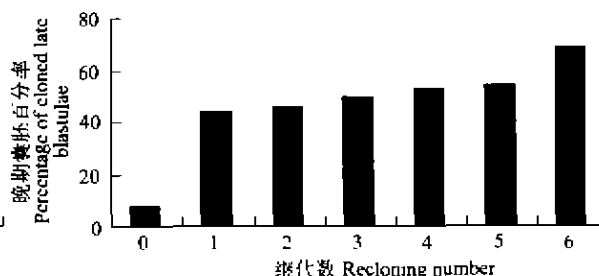


图3 继代移植对移核胚胎发育的影响  
Fig.3 Effects of recloning number on development of nuclear transfer embryos

能使供体核充分的再程序化。在这些因素中,研究最多的仍是细胞周期。Kono *et al.* (1992)和 Cheong *et al.* (1993)的研究表明,供体细胞周期严重影响移核胚胎的发育。Prather *et al.* (1992)和 Campbell *et al.* (1994)的研究表明,供体细胞处于  $G_0$  或  $G_1$  期有利于移核胚胎的发育。Mercer *et al.* (1990)研究发现培养细胞长到满瓶后,再在含 0.5% 胎牛血清的培养基中培养 3 d,可抑制细胞发育并处在  $G_0$  或  $G_1$  期。本文正是参照了这一方法,获得了同步  $G_0/G_1$  期的供体。Zakbartchenko *et al.* (1999)研究发现体细胞经血清饥饿后的移核胚胎的发育率明显好于未

饥饿的细胞。Wilmut *et al.* (1997)研究表明,供体细胞处于  $G_0$  的静止状态,对移核胚胎发育是必要的。他们利用血清饥饿后的细胞作供体,曾得到世界上第 1 例体细胞克隆羊。处于非静止状态的  $G_0$  或  $G_1$  期的供体体细胞,会导致供体核不充分的再程序化 (Sun *et al.*, 1992; Cibelli *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999)。但 Cibelli *et al.* (1998)认为核移植供体细胞处于  $G_0$  期并不重要,却又未报道所使用的供体核所处的细胞周期。如何改善核质配合和提高核移植的成功率还有待于深入研究。

## 参考文献:

- Briggs R, King T J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleate frog's eggs[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **38**:455-463.
- Campbell K H S, Loi P, Cappai L P, *et al.* 1994. Improved development to blastocyst of bovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of the enucleated activated oocyte[J]. *Biol. Reprod.*, **50**:1385-1393.
- Chen H X, Yi Y L, Chen M R, *et al.* 1986. Studies on the developmental potentiality of cultured cell nuclei of fish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **10**(1):1-7. [陈宏溪, 易咏兰, 陈敏容, 等 1986. 鱼类培养细胞核发育潜能的研究. 水生生物学报, **10**(1):1-7.]
- Chen M R, Chen H X, Yi Y L. 1985. The establishment of a heteroploid line from crucian carp and its biological characteristics[J]. *Journal of Fisheries of China*, **9**(2):121-130. [陈敏容, 陈宏溪, 易咏兰. 1985. 鲫鱼异倍体细胞的建立及生物学特性. 水产学报, **9**(2):121-130.]
- Cheong H T, Takahashi Y, Kanagawa H. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes[J]. *Biol. Reprod.*, **48**:958-963.
- Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, *et al.* 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. *Science*, **280**:1256-1258.
- Comandon J, Fondrune P de. 1939. Greffe nucléaire totale, Simple ou multiple Chey une Amibe[J]. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **130**:744-748.
- DiBerardino M A, Hoffner N J, Etkin L D. 1984. Activation of dormant genes in specialized cells[J]. *Science*, **224**:946-952.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, *et al.* 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. *Science*, **282**:2095-2098.
- Kono T, Kwon O Y, Watanabe T, *et al.* 1992. Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stages of the second cell cycle[J]. *J. Reprod. Fert.*, **94**:481-487.
- Kwon O Y, Kono T. 1996. Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**:13010-13013.
- Liu T M, Wu Q J. 2000. Progress of nuclear transplantation in teleost[J]. *Biotechnology Information*, **6**:24-29. [刘同明, 吴清江. 2000. 硬骨鱼类细胞核移植的研究进展. 生物技术通报, **6**:24-29.]
- Mercer W E, Shields M, Armin M, *et al.* 1990. Negative growth regulation in a globlastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**:6156-6170.
- Piotrowska K, Modlinski J A, Korwin-Kossakowski M, *et al.* 2000. Effects of preactivation of ooplasts or synchronization of blastomere nuclei in  $G_1$  on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos[J]. *Biol. Reprod.*, **63**:677-682.
- Pollard J W, Walker J M. 1997. Basic cell culture protocols[A]. In: Methods in Molecular Biology[M]. New Jersey: Humana Press Inc 2-4.
- Prather R S, Stumpf T T, Rehkords L F. 1992. Nuclear transplantation as a method of producing genetically identical livestock[J]. *Anim. Biotechnol.*, **3**:67-79.
- Rideout W M, Wakayama T, Wutz A, *et al.* 2000. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning[J]. *Nat. Genet.*,

- 24(2):109-110.
- Rio G J, Magnavita F J, Rubin J A, *et al*. 1973. Characteristics of an established goldfish *Carassius auratus* (L.) cell line[J]. *J. Fish Biol.*, 5:315-321.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning[M]. Translated by Jin D Y, Li M F. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 1992. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社. 464-467.]
- Spemann H. 1938. Embryonic development and induction [M]. New York: Hafner Publishing Co. 210-211.
- Stice S L, Robl M. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transfer rabbit embryos[J]. *Biol. Reprod.*, 39:657-664.
- Sun F Z, Houlard J, Huang X, *et al*. 1992. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation[J]. *Development*, 1185:947-956.
- Tung T C, Ye Y F, Du M, *et al*. 1980. Nuclear transplantation in teleosts: Nucleo-cytoplasmic hybrid fish between common carp nuclei and crucian carp cytoplasm[J]. *Scientia Sinica*, 4:376-380. [童第周, 叶毓芬, 杜森, 等. 1980. 硬骨鱼类的细胞核移植: 鲤鱼细胞核和鲫鱼细胞质配合的杂种鱼. 中国科学, 4:376-380.]
- Tung T C, Wu S Q, Ye Y F, *et al*. 1963. Nuclear transplantation of fish [J]. *Chinese Science Bulletin*, 7:60-61. [童第周, 吴尚彪, 叶毓芬, 等. 1963. 鱼类细胞核的移植. 科学通报, 7:60-61.]
- Watanabe T, Kobayashi N, Sato Y, *et al*. 1978. Continuous cell line derived from the kidney of Tamame, *Oncorhynchus masou* [J]. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 44:415-418.
- Wells D N, Misica P M, Tervit H R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells[J]. *Biol. Reprod.*, 60:996-1005.
- Westhusin M E, Pryor J H, Bondioli K R. 1991. Nuclear transfer in the bovine embryos: a comparison of 5-day, 6-day, frozen thawed, and nuclear transfer donor embryos[J]. *Mol. Reprod. Dev.*, 28:119-123.
- Willadsen S M. 1989. Cloning sheep and cow embryos [J]. *Genome*, 31:956-962.
- Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al*. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 385:810-813.
- Wu C J, Chen R D, Ye Y Z, *et al*. 1981. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line[J]. *Acta Genetica Sinica*, 8(1):50-55. [吴清江, 陈荣德, 叶玉珍, 等. 1981. 鲤鱼人工雌核发育及其作为建立近交系新途径的研究. 遗传学报, 8(1):50-55.]
- Yu L N, Yang Y Q, Liu L, *et al*. 1989. Study on the fish cell nucleus transplant with egg not take off the nucleus as a receptor[J]. *Freshwater Fisheries*, 3:3-7. [余来宁, 杨永铨, 柳凌, 等. 1989. 用未去核的卵作受体的鱼类细胞核移植研究. 淡水渔业, 3:3-7.]
- Yu L N, Zuo W G, Fang Y L, *et al*. 1996. Cell-engineering grass carp produced by the combination of electric fusion and nuclear transplantation[J]. *Journal of Fisheries of China*, 20(4):312-318. [余来宁, 左文功, 方耀林, 等. 1996. 用电融合结合继代移植方法构建草鱼抗病体细胞工程鱼. 水产学报, 20(4):312-318.]
- Zakbartenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, *et al*. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning in the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts[J]. *J. Reprod. Fertil.*, 115:325-331.

(上接第 106 页)

了环志(张孚允, 1987)。1994 年 6 月, 马鸣等(1997)在沙雅对黑鹳(*Ciconia nigra*)进行了环志。1997-1999 年“中国-阿联酋项目组”利用卫星跟踪技术首次揭示了波斑鸨(*Chlamydotis macqueeni*)东西方向迁徙的过程(Launay, 1999)。2000 年全国鸟类环志中心在富蕴环志猛禽 19 只。2001 年 8 月 14~26 日笔者在阿勒泰和吐鲁番两地进行了鸟类环志工作, 这是新疆规模最大的一次环志活动。以下是 2001 年的工作简报。

## 1 方法

用化纤粘网、竹竿、布袋等作为捕鸟工具。使用全国鸟类环志中心提供的 A、B、C、D 4 种型号合金鸟环。通常在早晨或下午张网, 每 15~20 min 巡视 1 次。对上网的小鸟依规程(楚国忠等, 1998)先上环, 测量体重、翼长、尾长等基本数据, 拍摄和鉴定鸟种, 记录环号、种名、年龄、性别、肥满度和换羽状况等。环志和测量之后立即原地释放。

表 2 1976~2001 年在新疆回收到的邻国鸟环资料

Table 2 Recoveries of the birds those banded in neighboring countries from 1976 to 2001 in Xinjiang

环号 Ring	环志国 Country	回收日期 Recovery date	回收地 Recovery site	鸟种 Species	回收人 Observer	信息来源 Reference
C26249	印度	1976-09-11 之前	叶城			新疆公安局
F32110	印度	1976-09-11 之前	麦盖提	骨顶鸡		新疆公安局
G 4157	印度		喀什			新疆公安局
X 1672	印度		喀什			新疆公安局
A116410	原苏联	1977-10 之前	巴音郭楞自治州	鸥		新疆公安局
C198163	原苏联	1976-11 上旬	阿克苏农垦 16 团	大白鹭	常发茂	新疆公安局
G-9492	印度赫里盖	1984-04-21	阿克苏塔里木河	赤嘴潜鸭	方新平	张孚允等, 1997
G-40244	印度赫里盖	1985-03-17	巴楚	赤嘴潜鸭	赵尊东	张孚允等, 1997
XB805996	原苏联	1989-05-07	巩留	家燕		张孚允等, 1997
黄色塑料环	俄罗斯?	2001-09-18	石河子葡萄园	红骨顶	徐捷	马鸣, 2001-09

(下转第 135 页)